

TITLE: Manufacture of carotenoids with **Dunaliella**  
 INVENTOR(S): Hayashi, Katsuhiko  
 PATENT ASSIGNEE(S): Nikken Sohonssha Corp., Japan  
 SOURCE: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 pp.  
 CODEN: JKXXAF  
 DOCUMENT TYPE: Patent  
 LANGUAGE: Japanese  
 FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1  
 PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 2003180387	A2	20030702	JP 2001-386330	20011219 <--
PRIORITY APPLN. INFO.:			JP 2001-386330	20011219

AB Phytoene-containing carotenoids are manufactured by culture of **Dunaliella** in pH-adjusted media in the presence of nicotine as a productivity regulator under light irradiation **Dunaliella** was aerobically cultured in a medium containing 0.32 mg/2.0 mL nicotine at 25° and pH 7 under 2000 lx for .apprx.200 h. The cultured **Dunaliella** was fed to rats to show **blood sugar** lowering and colon tumor inhibition.

First Hit

L5: Entry 1 of 2

File: JPAB

Jul 2, 2003

PUB-NO: JP02003180387A  
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 2003180387 A  
TITLE: METHOD FOR PRODUCING CAROTENOID

PUBN-DATE: July 2, 2003

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

HAYASHI, KATSUHIKO

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

NIKKEN SOHONSHA CORP

APPL-NO: JP2001386330

APPL-DATE: December 19, 2001

INT-CL (IPC): C12 P 5/02

## ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To easily obtain carotenoids by culturing Dunaliella algae in a specific medium so as to include phytoene(s) as acyclic carotenoid(s) other than carotenoids conventionally produced by culturing the Dunaliella algae.

SOLUTION: The carotenoids including the phytoene(s) as acyclic carotenoid(s) are obtained by culturing the Dunaliella algae under light irradiation in a pH-adjusted medium which is incorporated with nicotine as a production capacity regulator; wherein the amount of the regulator incorporated is preferably 1  $\mu$ M-1 M.

COPYRIGHT: (C)2003,JPO

**End of Result Set**

Jul 2, 2003

PRIORITY-DATA: 2001JP-0386330 (December 19, 2001)

Clear

## C12P005/02

## 2001JP-0386330

http://westbrs:9000/bin/cgi-bin/accum\_query.pl?MODE=%20%20%20%20Display%20%20%... 6/6/06

treating cancer, diabetes, hepatic disorders and other life style related diseases.

ADVANTAGE - The method effectively manufactures carotinoide containing phytoene using Dunaliella algae. The method is simple.

ABSTRACTED-PUB-NO: JP2003180387A

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/2

DERWENT-CLASS: B04 D16

CPI-CODES: B04-F08; B14-C03; B14-H01; B14-N12; B14-S04; D05-C; D05-H08;

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **2003-180387**

(43)Date of publication of application : **02.07.2003**

---

(51)Int.Cl.

C12P 5/02

---

(21)Application number : **2001-386330** (71)Applicant : **NIKKEN SOHONSHA CORP**

(22)Date of filing : **19.12.2001** (72)Inventor : **HAYASHI KATSUHIKO**

---

### (54) METHOD FOR PRODUCING CAROTENOID

#### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To easily obtain carotenoids by culturing Dunaliella algae in a specific medium so as to include phytoene(s) as acyclic carotenoid(s) other than carotenoids conventionally produced by culturing the Dunaliella algae.

SOLUTION: The carotenoids including the phytoene(s) as acyclic carotenoid(s) are obtained by culturing the Dunaliella algae under light irradiation in a pH-adjusted medium which is incorporated with nicotine as a production capacity regulator; wherein the amount of the regulator incorporated is preferably 1  $\mu$ M-1 M.

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.11.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

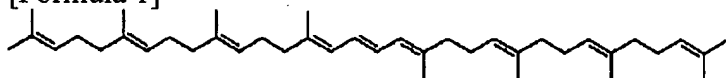
[Claim 1] The manufacture approach of the carotinoid characterized by obtaining the carotinoid containing the phytoene which is a non-ring type carotinoid by adding nicotine as a production ability modifier and cultivating the Dunaliella frond under the environment of an optical exposure by the culture medium which performed pH adjustment.

[Claim 2] The manufacture approach of a carotinoid according to claim 1 that the addition of said production ability modifier is characterized by being 1microM-1M.

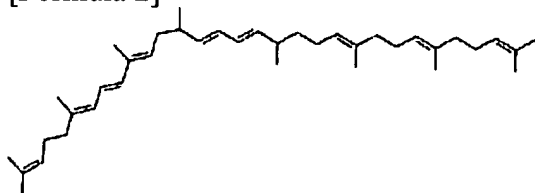
[Claim 3] The manufacture approach of the carotinoid according to claim 1 characterized by said culture medium being a culture medium containing the sodium chloride of 1.5M, the sodium hydrogencarbonate of 50mM, the magnesium sulfate of 5mM, the potassium nitrate of 2mM, the calcium chloride of 0.3mM, the potassium dihydrogenphosphate of 0.2mM, the ferric chloride of 1.5microM, EDTA of 6microM, the manganese chloride of 7microM, the cupric chloride of 1microM, the zinc chloride of 1microM, the cobalt chloride of 1microM, and the ammonium molybdate of 1microM.

[Claim 4] The manufacture approach of the carotinoid according to claim 1 characterized by being the all trans-form phytoene in which said phytoene has the structure expression expressed with following \*\* 1, and/or 9-cis form phytoene which has the structure expression expressed with following \*\* 2.

[Formula 1]



[Formula 2]



---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the manufacture approach of the carotinoid containing the phytoene which is a non-ring type carotinoid by cultivating the Dunaliella frond by the specific culture medium.

[0002]

[Description of the Prior Art] The manufacture approach of the carotinoid which exists from the former Ami Ben-Amotz Reported reference [EFFECT OF LOW TEMPERATURE ON THE STEREOISOMER COMPOSITION OF beta-CAROTENE IN THE HALOTOLERANT ALGA DUNALIELLA BARDAWIL /J.phycol.32,272-275(1996)] etc. -- as indicated The sodium chloride of 1.5M, the sodium hydrogencarbonate of 50mM, the magnesium sulfate of 5mM, The potassium nitrate of 2mM(s), the calcium chloride of 0.3mM, the potassium dihydrogenphosphate of 0.2mM, By the culture medium which contained the ferric chloride of 1.5microM, EDTA of 6microM, the manganese chloride of 7microM, the cupric chloride of 1microM, the zinc chloride of 1microM, the cobalt chloride of 1microM, and the ammonium molybdate of 1microM, and was prepared to pH8 The Dunaliella frond shall be cultivated while irradiating light.

[0003] The carotinoids obtained from this conventional manufacture approach are mainly all trans-form beta carotene and 9-cis form beta carotene, and containing all trans-form alpha-carotene, all trans-form gamma-carotene, beta-cryptoxanthin, ECHINENON, a lutein, violaxanthin, zeaxanthin, etc. is known.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, in culture of said Dunaliella frond, the carotinoid which contains especially the phytoene which is a useful non-ring type carotinoid in cancer, prevention of a lifestyle-related disease, etc. was not able to be manufactured.

[0005] Then, this invention is made by cultivating the Dunaliella frond by the specific culture medium for the purpose of manufacturing simply the carotinoid containing the phytoene which are non-ring type carotinoids other than the carotinoid manufactured by culture of the conventional Dunaliella frond.

[0006]

[Means for Solving the Problem] Therefore, the manufacture approach of the carotinoid this invention shall have obtained the carotinoid containing the phytoene which is a non-ring type carotinoid by adding nicotine as a production ability modifier, being the culture medium which performed pH adjustment and cultivating the Dunaliella frond under the environment of an optical exposure.

[0007] the Dunaliella frond used by this invention -- the Dunaliella salina kind (Dunaliella salina) and the Dunaliella bar DAWIRU kind (Dunaliella bardawil) etc. -- the kind belonging to all the Dunaliella groups shall be included

[0008] As for the addition of said production ability modifier, in this invention, 1microM-1M are desirable. If it is under 1microM or 1M are exceeded, the production ability of phytoene will fall or production ability will be lost.

[0009] In this invention, the culture medium which cultivates the Dunaliella frond Although what kind



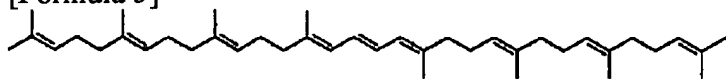
of culture medium is sufficient as long as it can cultivate the Dunaliella frond For example, said Ami Ben-Amotz As [ indicated / by the reported reference ] The sodium chloride of 1.5M, the sodium hydrogencarbonate of 50mM, the magnesium sulfate of 5mM, The potassium nitrate of 2mM(s), the calcium chloride of 0.3mM, the potassium dihydrogenphosphate of 0.2mM, It can consider as the culture medium containing the ferric chloride of 1.5microM, EDTA of 6microM, the manganese chloride of 7microM, the cupric chloride of 1microM, the zinc chloride of 1microM, the cobalt chloride of 1microM, and the ammonium molybdate of 1microM.

[0010] In this invention, as an environment where the Dunaliella frond is cultivated, culture temperature has the desirable range of about 25-35 degrees C, as for pH of a culture medium, about 7-8 is desirable, and it is desirable. [ of the bottom of the environment of an optical exposure of about 2,000 to 40,000 Lux ]

[0011] the phytoene as used in the field of this invention -- all trans-form phytoene, 9-cis form phytoenes, and these isomers -- it is all a \*\*\*\* and a non-ring type carotinoid with all useful to prevention of cancer, prevention of the lifestyle-related disease of diabetes mellitus, liver disease, cancer, and others, an improvement, etc., and all trans-form phytoene has the structure expression of following \*\* 3, and 9-cis form phytoene has the structure expression of following \*\* 4.

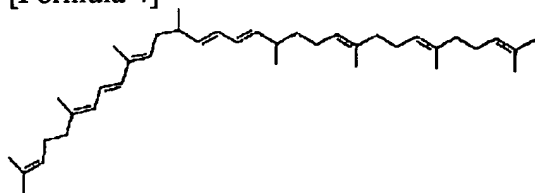
[0012]

[Formula 3]



[0013]

[Formula 4]



[0014]

[Example] Next, the desirable example of the manufacture approach of the carotinoid of this invention is given. In addition, the manufacture approach (the manufacture approach of the carotinoid indicated by the reference which said Ami Ben-Amotz has reported) of the conventional carotinoid is mentioned as an example of a comparison.

[0015] (Example 1) It put into the flask containing 2.0l. of culture media of the presentation which shows 2g of Dunaliella fronds in Table 1, and nicotine 0.32mg was added, and it cultivated for about 200 hours, carrying out aeration of the air which contains 1% of carbon dioxide under the environment of the culture temperature of about 25 degrees C, a culture medium pH 7, and an optical exposure of 2,000Lux.

[0016] (Example 2) It put into the flask containing 0.5l. of culture media of the presentation which shows 0.5g of Dunaliella fronds in Table 1, and nicotine 81g was added, and it cultivated for about 150 hours, carrying out aeration of the air which contains 1% of carbon dioxide under the environment of the culture temperature of about 35 degrees C, a culture medium pH 8, and an optical exposure of 40,000Lux.

[0017] (Example 3) It put into the raceway tank (10m wide, the length of 2m, a depth of 1m) containing 2,000l. of culture media of the presentation which shows 2kg of Dunaliella fronds in Table 1, nicotine 0.324g was added, and it cultivated outdoors for about 200 hours under the environment of the culture temperature of about 25 degrees C, a culture medium pH 8, and a sunlight exposure.

[0018] (Example 4) It put into the culture tube (die length of 50m, diameter of 0.2m) containing 150l. of culture media of the presentation which shows 150g of Dunaliella fronds in Table 1, nicotine 24.3kg

was added, and it cultivated outdoors for about 150 hours under the environment of the culture temperature of about 35 degrees C, a culture medium pH 8, and a sunlight exposure.

[0019] (Example of a comparison) 1g of Dunaliella fronds was put into the flask containing 0.5l. of culture media of the presentation shown in Table 1, and they were cultivated as it was for about 150 hours under the environment of the culture temperature of about 35 degrees C, a culture medium pH 8, and an optical exposure of 40,000Lux.

[0020]

[Table 1]

培 地 組 成 (精製水 1 リットル中)	
塩化ナトリウム	8 7 . 6 g
炭酸水素ナトリウム	4 . 2 g
硫酸マグネシウム	0 . 6 g
硝酸カリウム	0 . 2 g
塩化カルシウム	0 . 0 3 g
リン酸二水素カリウム	0 . 0 3 g
塩化第二鉄	0 . 2 4 m g
エチレンジアミン四酢酸	1 . 7 5 m g
塩化マンガン	0 . 8 8 m g
塩化第二銅	0 . 1 3 m g
塩化亜鉛	0 . 1 4 m g
塩化コバルト	0 . 1 3 m g
モリブデン酸アンモニウム	1 . 1 6 m g

[0021] Next, the result of having carried out three-dimensions data analysis of the carotinoid extracted from the Dunaliella frond cultivated in the example 1 by the high-speed liquid chromatograph is shown in drawing 1 . Since b of a in drawing 1 corresponded with the absorption maximum wavelength of 9-cis form phytoene standard substance in accordance with the absorption maximum wavelength of the all trans-form phytoene standard substance, existence of these carotinoids was checked by the manufacture approach of this invention. In addition, c in drawing 1  $R > 1$  is the absorption maximum wavelength of all trans-form beta carotene, and d in drawing 1 was the absorption maximum wavelength of 9-cis form beta carotene, it could check the absorption maximum wavelength of main carotinoids, and has also checked existence of these carotinoids.

[0022] Moreover, the result of having carried out three-dimensions data analysis of the carotinoid extracted from the Dunaliella frond cultivated in the example of a comparison by the high-speed liquid chromatograph is shown in drawing 2 . Although the absorption maximum wavelength corresponding to all trans-form beta carotene and 9-cis form beta carotene has been checked from drawing 2 as shown in c and d, the absorption maximum wavelength corresponding to all trans-form phytoene and 9-cis form phytoene was not able to be checked.

[0023] Furthermore, the experiment about a blood sugar level fall operation was conducted using the Dunaliella frond cultivated in the example 1, and the Dunaliella frond cultivated in the example of a comparison.

[0024] (The experiment approach) Habituation breeding of the 30 4-weeks old ddy system mice was carried out for one week. Administration (100 mg/kg) among the abdominal cavity was performed for

the streptozotocin (STZ) melted to the physiological saline to said mouse used as 5 weeks old 3 times, and the blood sugar level chose the mouse of 200 or more mg/dl as it. As the administration group II (dose 60 mg/kg) which dissolved the Dunaliella frond which divided these mice into two groups, made the administration group I (dose 60 mg/kg) which dissolved the Dunaliella frond cultivated in the example 1 in cone oil, and was cultivated in the example of a comparison in cone oil Feed was prescribed for the patient for two weeks, respectively, and the blood sugar level was measured with the ortho-toluidine-boric acid method (OTB acid method) with time. In addition, the mouse which does not prescribe said STZ for the patient was made into the control group, this control group was also medicated with feed for two weeks, and the blood sugar level was measured with the OTB acid method with time. A measurement result is shown in Table 2.

[0025]

[Table 2]

	投与前	投与後	血糖値低下率
投与群 I	236 mg / dl	127 mg / dl	46%
投与群 II	236 mg / dl	164 mg / dl	31%
对照群	137 mg / dl	137 mg / dl	—

[0026] From Table 2, the carotinoid obtained by the manufacture approach of this invention became distinct [ reducing the blood sugar level intentionally ] from the carotinoid obtained by the conventional manufacture approach.

[0027] Next, the experiment about antitumor action was conducted using the Dunaliella frond cultivated in the example 1, and the Dunaliella frond cultivated in the example of a comparison.

[0028] (The experiment approach) 120 6-weeks old Sprague-Dawley system male rats [ 30 ] (SD system male rat) were divided into each four groups, and hypodermically [ regions-of-back ] was medicated with 1 and 2-dimethylhydrazine (DMH) dissolved in distilled water at a rate of 10 mg/kg at the 1st group - the 3rd group over 1 time per week, and ten weeks. The 1st group was made to carry out free intake of the basal diet which added the Dunaliella frond cultivated in the example 1 at 0.05% of a rate till experiment termination after prescribing DMH for the patient. The 2nd group was made to carry out free intake of the basal diet which added the Dunaliella frond cultivated in the example of a comparison at 0.05% of a rate till experiment termination. The 3rd group was made to carry out free intake of the carotinoid additive-free basal diet till experiment termination. The 4th group considered as the DMH control group non-taken a measure, and carried out free intake of the carotinoid additive-free basal diet till experiment termination. It ended in 40 weeks and the experiment was observed on the pathology histology target about generating of a large intestine neoplasm. An observation result is shown in Table 3.

[0029]

[Table 3]

	大腸腫瘍	( 管状腺癌 , 印環細胞癌 )
第1群	6匹 (20.0%)	( 5匹 (16.7%) , 1匹 (3.5%) )
第2群	14匹 (48.3%)	( 13匹 (44.8%) , 1匹 (3.5%) )
第3群	23匹 (79.3%)	( 22匹 (75.8%) , 1匹 (3.5%) )
第4群	0匹 ( — % )	( 0匹 ( — % ) , 0匹 ( — % ) )

[0030] SD system male rat which SD system male rat which the incidence rate of a large intestine neoplasm made take in carotinoid additive-free basal diet is 79.3%, and made take in the basal diet which added the carotinoid obtained by the conventional manufacture approach from Table 3 was 48.3%. However, SD system male rat made to take in the basal diet which added the carotinoid obtained by the manufacture approach of this invention is 20.0%, and antitumor action with the carotinoid more remarkable than the carotinoid obtained by the conventional manufacture approach which has controlled generating of a large intestine neoplasm greatly and is obtained by the manufacture approach of this invention was accepted.

[0031]

[Effect of the Invention] This invention was constituted as stated above, by cultivating the Dunaliella frond by the specific culture medium, manufactured simply the carotinoid containing the phytoene which are non-ring type carotinoids other than the carotinoid manufactured by culture of the conventional Dunaliella frond, and was able to carry out the thing of it.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-180387

(P2003-180387A)

(43) 公開日 平成15年7月2日 (2003.7.2)

(51) Int.Cl.

C 1 2 P 5/02

識別記号

F I

C 1 2 P 5/02

キーワード(参考)

4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2001-386330(P2001-386330)

(22) 出願日 平成13年12月19日 (2001. 12. 19)

(71) 出願人 399127603

株式会社日健総本社

岐阜県羽島市福寿町浅平1丁目32番地

(72) 発明者 林 勝彦

岐阜県羽島市江吉良町1397番地の2

(74) 代理人 100072213

弁理士 辻本 一義

Fターム(参考) 4B064 AB04 CA08 CC03 CC06 CC07

CC09 CC12 CC30 CD01 CD02

CD12 DA01 DA10

(54) 【発明の名称】 カロチノイドの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ドナリエラ藻体を特定の培地で培養することにより、従来のドナリエラ藻体の培養により製造されるカロチノイド以外の非環式カロチノイドであるフィトエンを含有するカロチノイドを簡単に製造する。

【解決手段】 産生能調節剤としてニコチンを添加し、pH調整を行った培地で、光照射的环境下、ドナリエラ藻体を培養することにより、非環式カロチノイドであるフィトエンを含有するカロチノイドを得るようにしている。産生能調節剤の添加量は、1  $\mu$ M~1 Mが好ましい。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 産生能調節剤としてニコチンを添加し、pH調整を行った培地で、光照射の環境下、ドナリエラ藻体を培養することにより、非環式カロチノイドであるフィトエンを含有するカロチノイドを得ることを特徴とするカロチノイドの製造方法。

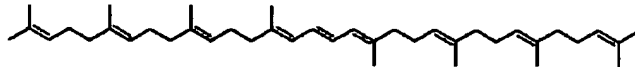
【請求項2】 前記産生能調節剤の添加量が、 $1\mu\text{M}$ ～ $1\text{M}$ であることを特徴とする請求項1記載のカロチノイドの製造方法。

【請求項3】 前記培地が、 $1.5\text{M}$ の塩化ナトリウム、 $50\text{mM}$ の炭酸水素ナトリウム、 $5\text{mM}$ の硫酸マグネシウム、 $2\text{mM}$ の硝酸カリウム、 $0.3\text{mM}$ の塩化カ

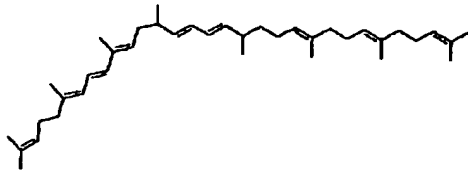
\*ルシウム、 $0.2\text{mM}$ のリン酸二水素カリウム、 $1.5\mu\text{M}$ の塩化第二鉄、 $6\mu\text{M}$ のEDTA、 $7\mu\text{M}$ の塩化マンガン、 $1\mu\text{M}$ の塩化第二銅、 $1\mu\text{M}$ の塩化亜鉛、 $1\mu\text{M}$ の塩化コバルト、 $1\mu\text{M}$ のモリブデン酸アンモニウムを含有する培地であることを特徴とする請求項1記載のカロチノイドの製造方法。

【請求項4】 前記フィトエンが、下記の化1で表される構造式を有するオールトランス型フィトエン、および/または下記の化2で表される構造式を有する9-シス型フィトエンであることを特徴とする請求項1記載のカロチノイドの製造方法。

## 【化1】



## 【化2】



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、ドナリエラ藻体を特定の培地で培養することによる非環式カロチノイドであるフィトエンを含有するカロチノイドの製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来から存在するカロチノイドの製造方法は、Ami Ben-Amotz が報告している文献[EFFECT OF LOW TEMPERATURE ON THE STEREOISOMER COMPOSITION OF  $\beta$ -CAROTENE IN THE HALOTOLERANT ALGA DUNALIELLA BARDAWIL / J.phycol.32,272-275(1996)]等に記載されているように、 $1.5\text{M}$ の塩化ナトリウム、 $50\text{mM}$ の炭酸水素ナトリウム、 $5\text{mM}$ の硫酸マグネシウム、 $2\text{mM}$ の硝酸カリウム、 $0.3\text{mM}$ の塩化カルシウム、 $0.2\text{mM}$ のリン酸二水素カリウム、 $1.5\mu\text{M}$ の塩化第二鉄、 $6\mu\text{M}$ のEDTA、 $7\mu\text{M}$ の塩化マンガン、 $1\mu\text{M}$ の塩化第二銅、 $1\mu\text{M}$ の塩化亜鉛、 $1\mu\text{M}$ の塩化コバルト、 $1\mu\text{M}$ のモリブデン酸アンモニウムを含有しpH8に調整した培地で、光を照射しながらドナリエラ藻体を培養するものとしている。

【0003】この従来の製造方法より得られるカロチノイドは、主としてオールトランス型 $\beta$ -カロチン、9-シス型 $\beta$ -カロチンであり、オールトランス型 $\alpha$ -カロチン、オールトランス型 $\gamma$ -カロチン、 $\beta$ -クリプトキサンチン、エチネノン、ルテイン、ピオラキサンチン、ゼアキサンチンなども含有することが知られている。

## 【0004】

※50

【0005】そこで、この発明は、ドナリエラ藻体を特定の培地で培養することにより、従来のドナリエラ藻体の培養により製造されるカロチノイド以外の非環式カロチノイドであるフィトエンを含有するカロチノイドを簡単に製造することを目的となされたものである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】そのため、この発明のカロチノイドの製造方法は、産生能調節剤としてニコチンを添加し、pH調整を行った培地で、光照射の環境下、ドナリエラ藻体を培養することにより、非環式カロチノイドであるフィトエンを含有するカロチノイドを得るものとしている。

【0007】この発明で用いられるドナリエラ藻体は、ドナリエラ・サリーナ種(Dunaliella salina)、ドナリエラ・バーダウィル種(Dunaliella bardawil)などのすべてのドナリエラ属に属する種を含むものとする。

【0008】この発明において、前記産生能調節剤の添加量は、 $1\mu\text{M}$ ～ $1\text{M}$ が好ましい。 $1\mu\text{M}$ 未満であったり $1\text{M}$ を越えると、フィトエンの産生能が低下したり、産生能がなくなる。

【0009】この発明において、ドナリエラ藻体を培養する培地は、ドナリエラ藻体が培養できればどのような培地でもよいが、例えば、前記Ami Ben-Amotz が報告している文献に記載されたような、 $1.5\text{M}$ の塩化ナトリウム、 $50\text{mM}$ の炭酸水素ナトリウム、 $5\text{mM}$ の硫酸マグネシウム、 $2\text{mM}$ の硝酸カリウム、 $0.3\text{mM}$ の塩化カルシウム、 $0.2\text{mM}$ のリン酸二水素カリウム、 $1.5\mu\text{M}$ の塩化第二鉄、 $6\mu\text{M}$ のEDTA、 $7\mu\text{M}$ の塩化マンガン、 $1\mu\text{M}$ の塩化第二銅、 $1\mu\text{M}$ の塩化亜鉛、 $1\mu\text{M}$ の塩化コバルト、 $1\mu\text{M}$ のモリブデン酸アンモニウムを含有する培地とすることができる。

※【発明が解決しようとする課題】しかしながら、前記ドナリエラ藻体の培養では、癌や生活習慣病の予防などに特に有用な非環式カロチノイドであるフィトエンを含有するカロチノイドを製造することができなかった。

20 【0005】そこで、この発明は、ドナリエラ藻体を特定の培地で培養することにより、従来のドナリエラ藻体の培養により製造されるカロチノイド以外の非環式カロチノイドであるフィトエンを含有するカロチノイドを簡単に製造することを目的となされたものである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】そのため、この発明のカロチノイドの製造方法は、産生能調節剤としてニコチンを添加し、pH調整を行った培地で、光照射の環境下、ドナリエラ藻体を培養することにより、非環式カロチノイドであるフィトエンを含有するカロチノイドを得るものとしている。

【0007】この発明で用いられるドナリエラ藻体は、ドナリエラ・サリーナ種(Dunaliella salina)、ドナリエラ・バーダウィル種(Dunaliella bardawil)などのすべてのドナリエラ属に属する種を含むものとする。

【0008】この発明において、前記産生能調節剤の添加量は、 $1\mu\text{M}$ ～ $1\text{M}$ が好ましい。 $1\mu\text{M}$ 未満であったり $1\text{M}$ を越えると、フィトエンの産生能が低下したり、産生能がなくなる。

【0009】この発明において、ドナリエラ藻体を培養する培地は、ドナリエラ藻体が培養できればどのような培地でもよいが、例えば、前記Ami Ben-Amotz が報告している文献に記載されたような、 $1.5\text{M}$ の塩化ナトリウム、 $50\text{mM}$ の炭酸水素ナトリウム、 $5\text{mM}$ の硫酸マグネシウム、 $2\text{mM}$ の硝酸カリウム、 $0.3\text{mM}$ の塩化カルシウム、 $0.2\text{mM}$ のリン酸二水素カリウム、 $1.5\mu\text{M}$ の塩化第二鉄、 $6\mu\text{M}$ のEDTA、 $7\mu\text{M}$ の塩化マンガン、 $1\mu\text{M}$ の塩化第二銅、 $1\mu\text{M}$ の塩化亜鉛、 $1\mu\text{M}$ の塩化コバルト、 $1\mu\text{M}$ のモリブデン酸アンモニウムを含有する培地とすることができる。

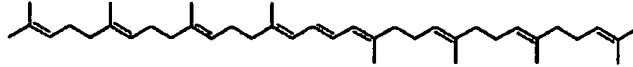
【0010】この発明において、ドナリエラ藻体を培養する環境として、培養温度は約25～35℃の範囲が好ましく、培地のpHは約7～8が好ましく、約2,000～40,000Luxの光照射の環境の下が好ましい。

【0011】この発明でいうフィトエンとは、オールトランス型フィトエン、9-シス型フィトエンおよびこれ\*

\*らの異性体すべてであり、何れも癌の予防や、糖尿病、肝疾患、癌、その他の生活習慣病の予防、改善などに有用な非環式カロチノイドであり、オールトランス型フィトエンは下記の化3の構造式を有しており、9-シス型フィトエンは下記の化4の構造式を有している。

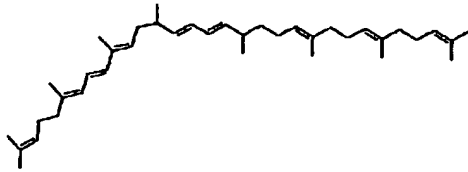
【0012】

【化3】



【0013】

【化4】



※00Luxの光照射の環境の下で約150時間培養した。

【0020】

【表1】

培 地 組 成 (精製水1リットル中)	
塩化ナトリウム	87.6g
炭酸水素ナトリウム	4.2g
硫酸マグネシウム	0.6g
硝酸カリウム	0.2g
塩化カルシウム	0.03g
リン酸二水素カリウム	0.03g
塩化第二鉄	0.24mg
エチレンジアミン四酢酸	1.75mg
塩化マンガン	0.88mg
塩化第二銅	0.13mg
塩化亜鉛	0.14mg
塩化コバルト	0.13mg
モリブデン酸アンモニウム	1.16mg

【0014】

【実施例】次に、この発明のカロチノイドの製造方法の好ましい実施例を挙げる。なお、従来のカロチノイドの製造方法（前記Ami Ben-Amotz が報告している文献に記載されたカロチノイドの製造方法）を比較例として挙げる。

【0015】（実施例1）ドナリエラ藻体2gを、表1に示す組成の培地2.0リットルが入ったフラスコに入れ、ニコチン0.32mgを添加し、培養温度約25℃、培地pH7.2、2,000Luxの光照射の環境の下で、1%の二酸化炭素を含む空気を通気しながら約200時間培養した。

【0016】（実施例2）ドナリエラ藻体0.5gを、表1に示す組成の培地0.5リットルが入ったフラスコに入れ、ニコチン81gを添加し、培養温度約35℃、培地pH8.40、000Luxの光照射の環境の下で、1%の二酸化炭素を含む空気を通気しながら約150時間培養した。

【0017】（実施例3）ドナリエラ藻体2kgを、表1に示す組成の培地2,000リットルが入ったレースウェイ水槽（横10m、縦2m、深さ1m）に入れ、ニコチン0.324gを添加し、培養温度約25℃、培地pH8、太陽光照射の環境の下、屋外で約200時間培養した。

【0018】（実施例4）ドナリエラ藻体150gを、表1に示す組成の培地150リットルが入った培養チューブ（長さ50m、直径0.2m）に入れ、ニコチン24.3kgを添加し、培養温度約35℃、培地pH8、太陽光照射の環境の下、屋外で約150時間培養した。

【0019】（比較例）ドナリエラ藻体1gを、表1に示す組成の培地0.5リットルが入ったフラスコに入れ、そのまま培養温度約35℃、培地pH8.40、0※50

【0021】次に、実施例1で培養したドナリエラ藻体から抽出したカロチノイドを高速液体クロマトグラフにより三次元データ解析した結果を図1に示す。図1中のaは、オールトランス型フィトエン標準物質の極大吸収波長と一致し、bは、9-シス型フィトエン標準物質の極大吸収波長と一致したので、この発明の製造方法によりこれらのカロチノイドの存在が確認された。なお、図1中のcは、オールトランス型β-カロチンの極大吸収波長であり、図1中のdは、9-シス型β-カロチンの極大吸収波長であり、主要なカロチノイドの極大吸収波長が確認でき、これらのカロチノイドの存在も確認できた。

【0022】また、比較例で培養したドナリエラ藻体から抽出したカロチノイドを高速液体クロマトグラフにより三次元データ解析した結果を図2に示す。図2から

は、cおよびdに示すように、オールトランス型 $\beta$ -カロチン、9-シス型 $\beta$ -カロチンに対応する極大吸収波長が確認できたが、オールトランス型フィトエンおよび9-シス型フィトエンに対応する極大吸収波長は確認することができなかった。

【0023】さらに、実施例1で培養したドナリエラ藻体と比較例で培養したドナリエラ藻体を用いて、血糖値低下作用についての実験を行った。

【0024】(実験方法) 4週齢ddy系マウス30匹を、1週間馴化飼育した。5週齢となった前記マウスに、生理食塩水に溶かしたストレプトゾトシン(STZ)を腹腔中投与(100mg/kg)を3回行い、血\*

\*糖値が200mg/dl以上のマウスを選択した。これらマウスを2群に分け、実施例1で培養したドナリエラ藻体をコーンオイルに溶解した投与群I(投与量60mg/kg)とし、比較例で培養したドナリエラ藻体をコーンオイルに溶解した投与群II(投与量60mg/kg)として、それぞれ飼料を2週間投与し、経時的に血糖値をオルトートルイジナーホウ酸法(OTB法)で測定した。なお、前記STZを投与しないマウスを対照群とし、この対照群にも飼料を2週間投与し、経時的に血糖値をOTB法で測定した。測定結果を表2に示す。

【0025】

【表2】

	投与前	投与後	血糖値低下率
投与群I	236mg/dl	127mg/dl	46%
投与群II	236mg/dl	164mg/dl	31%
対照群	137mg/dl	137mg/dl	—

【0026】表2より、この発明の製造方法で得られるカロチノイドは、従来の製造方法で得られるカロチノイドより、血糖値を有意に低下させることが明らかとなった。

【0027】次に、実施例1で培養したドナリエラ藻体と比較例で培養したドナリエラ藻体を用いて、抗腫瘍作用についての実験を行った。

【0028】(実験方法) 6週齢のSprague-Dawley系雄ラット(SD系雄ラット)120匹を30匹ずつ4群に分け、第1群~第3群には、蒸留水に10mg/kgの割合で溶解した1,2-ジメチルヒドラジン(DMH)を週1回、10週間に渡って背部皮下に投与した。DMHを投与後、第1群には、実施例1で培\*

※養したドナリエラ藻体を0.05%の割合で添加した基礎飼料を、実験終了まで自由摂取させた。第2群には、比較例で培養したドナリエラ藻体を0.05%の割合で添加した基礎飼料を、実験終了まで自由摂取させた。第3群には、カロチノイド無添加の基礎飼料を、実験終了まで自由摂取させた。第4群はDMH無処置の対照群とし、カロチノイド無添加の基礎飼料を、実験終了まで自由摂取させた。実験は40週で終了し、大腸腫瘍の発生について病理組織学的に観察した。観察結果を表3に示す。

【0029】

【表3】

	大腸腫瘍	〔管状腺癌	、印環細胞癌〕
第1群	6匹(20.0%)	〔5匹(16.7%), 1匹(3.5%)	〕
第2群	14匹(48.3%)	〔13匹(44.8%), 1匹(3.5%)	〕
第3群	23匹(79.3%)	〔22匹(75.8%), 1匹(3.5%)	〕
第4群	0匹(—%)	〔0匹(—%), 0匹(—%)	〕

【0030】表3より、大腸腫瘍の発生率は、カロチノイド無添加の基礎飼料を摂取させたSD系雄ラットが79.3%であり、従来の製造方法で得られるカロチノイドを添加した基礎飼料を摂取させたSD系雄ラットが48.3%であった。しかし、この発明の製造方法で得られるカロチノイドを添加した基礎飼料を摂取させたSD系雄ラットは20.0%であり、大腸腫瘍の発生を大きく抑制しており、この発明の製造方法で得られるカロチ★50

★ノイドは、従来の製造方法で得られるカロチノイドより、顕著な抗腫瘍作用が認められた。

【0031】

【発明の効果】この発明は、以上に述べたように構成されており、ドナリエラ藻体を特定の培地で培養することにより、従来のドナリエラ藻体の培養により製造されるカロチノイド以外の非環式カロチノイドであるフィトエンを含有するカロチノイドを簡単に製造することでき



た。

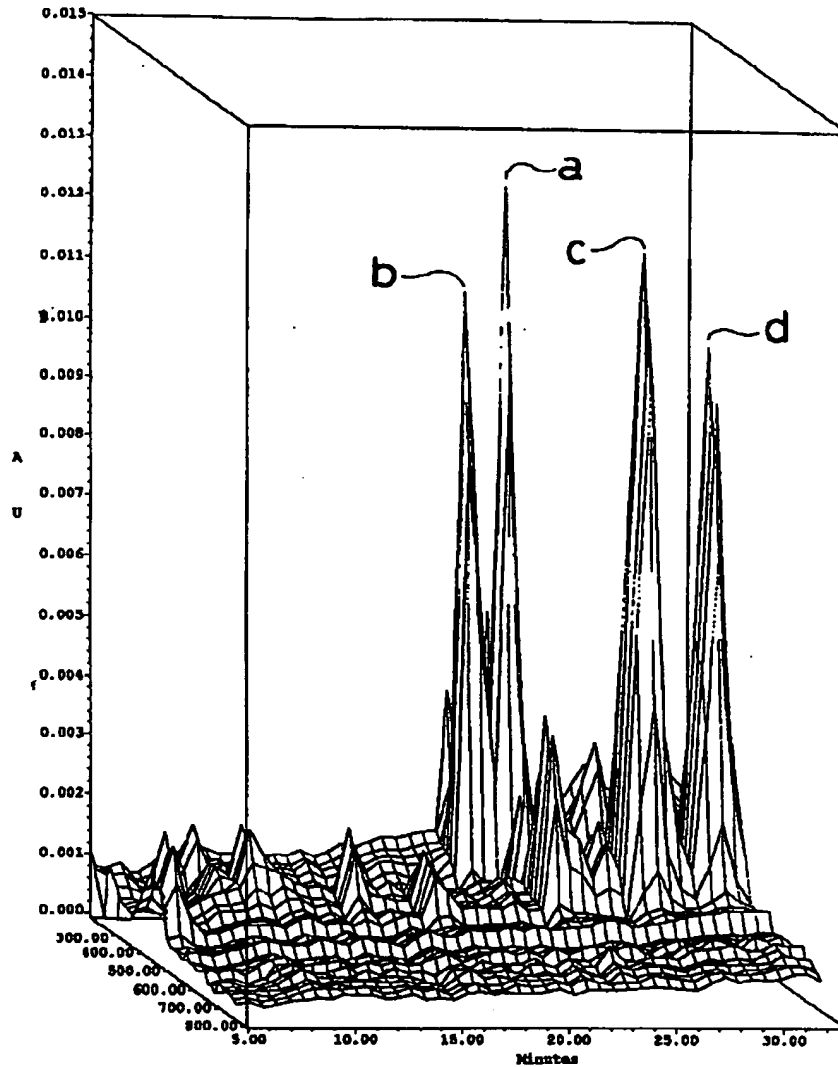
【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の製造方法により得たカロチノイドの高速液体クロマトグラフによる三次元データ解析図であ

る。

【図2】従来の製造方法により得たカロチノイドの高速液体クロマトグラフによる三次元データ解析図である。

【図1】



【図2】

